

07.06.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/3687

#2

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

2000年 5月23日

JUL 27 2000

出願番号
Application Number:

特願2000-151709

出願人
Applicant(s):

北興化学工業株式会社
財団法人微生物化学研究会

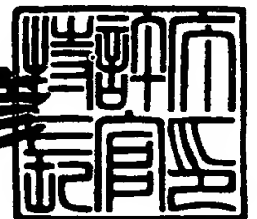
09/980453

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月29日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3054157

【書類名】 特許願

【整理番号】 12113

【提出日】 平成12年 5月23日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07C

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区宿河原2丁目42番25-201号

 【氏名】 高橋 篤

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区みたけ台7番地16

 【氏名】 神辺 健司

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県厚木市戸田2385番地 北興化学厚木寮

 【氏名】 森 哲也

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県厚木市戸田2385番地 北興化学厚木寮

 【氏名】 北 雄一

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県大和市中央林間5丁目18番4号

 【氏名】 玉村 健

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都品川区東五反田5丁目1番11号 ニューフジマ
ンション701

 【氏名】 竹内 富雄

【特許出願人】

 【識別番号】 000242002

 【氏名又は名称】 北興化学工業株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000173913

【氏名又は名称】 財団法人 微生物化学研究会

【代理人】

【識別番号】 100066452

【弁理士】

【氏名又は名称】 八木田 茂

【選任した代理人】

【識別番号】 100064388

【弁理士】

【氏名又は名称】 浜野 孝雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100067965

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 哲二

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第159861号

【出願日】 平成11年 6月 7日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第340523号

【出願日】 平成11年11月30日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008796

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9102743

【包括委任状番号】 9102652

特 2 0 0 0 - 1 5 1 7 0

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 L-エピー-2-イノソースの新規製造法とエピーイノシトールの新規製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる変換能を有する微生物を、ミオーイノシトールに作用させて、前記ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換させてL-エピー-2-イノソースを生成することから成ることを特徴とする、L-エピー-2-イノソースの製造方法。

【請求項2】 請求項1記載のミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる変換能を有する微生物が細菌である請求項1に記載のL-エピー-2-イノソースの製造方法。

【請求項3】 請求項1記載のミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる変換能を有する微生物がグラム陰性細菌である請求項1に記載のL-エピー-2-イノソースの製造方法。

【請求項4】 請求項1記載のミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる変換能を有する微生物が、グラム陰性細菌であり、シュードモナダセア (Pseudomonadaceae) 科に属するキサントモナス (Xanthomonas) 属またはシュードモナス (Pseudomonas) 属の細菌、あるいはアセトバクテラセア (Acetobacteraceae) 科に属するアセトバクター (Acetobacter) 属またはグルコノバクター (Gluconobacter) 属の細菌、あるいはリゾビアセア (Rhizobiaceae) 科に属するアグロバクテリウム (Agrobacterium) 属の細菌、あるいはエンテロバクテリアセア (Enterobacteriaceae) 科に属するエルウィニア (Erwinia) 属、エンテロバクター (Enterobacter) 属、セラチア (Serratia) 属またはエルシニア (Yersinia) 属の細菌、あるいはバステウレアセア (Pasteurellaceae) 科に属するバステウレラ (Pasteurella) 属またはヘモフィルス (Haemophilus) 属の細菌から選ばれるグラム陰性細菌である請求項1に記載のL-エピー-2-イノソースの製造方法。

【請求項5】 請求項1記載のミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソ

ースへ変換できる変換能を有する微生物が、キサントモナス (*Xanthomonas*) ・
エスピー AB 1 0 1 1 9 株 (FERM P-1 7 3 8 2 として寄託) あるいはシ
ュードモナス (*Pseudomonas*) ・エスピー AB 1 0 2 1 5 株 (FERM P-1
7 8 0 4 として寄託) あるいはエルウィニア (*Erwinia*) ・エスピー AB 1 0 1
3 5 株 (FERM P-1 7 8 0 3 として寄託) である請求項 1 に記載の L-エ
ピー 2-イノソースの製造方法。

【請求項 6】 請求項 1 に記載のミオーイノシトールを L-エピー 2-イノ
ソースへ変換できる変換能を有する微生物を、ミオーイノシトール並びに炭素源
及び窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養し、その培養液中において該微生
物をミオーイノシトールに作用させて培養液中に L-エピー 2-イノソースを生
成、蓄積させる、請求項 1 に記載の L-エピー 2-イノソースの製造方法。

【請求項 7】 請求項 1 に記載のミオーイノシトールを L-エピー 2-イノ
ソースへ変換できる変換能を有する微生物を培養し、得られた培養物から該微生
物の菌体を分離し、該菌体をミオーイノシトールを含む緩衝液または液体培地に
加え、該緩衝液または液体培地中でミオーイノシトールと反応させ、得られた反
応液中に L-エピー 2-イノソースを生成させる工程を含む、請求項 1 に記載の
L-エピー 2-イノソースの製造方法。

【請求項 8】 請求項 6 または請求項 7 記載の方法により、生成、蓄積さ
れた L-エピー 2-イノソースを含有する培養液または反応液を取得し、さらに
該培養液または反応液から、菌体を除去し、その後、菌体を除去された L-エ
ピー 2-イノソースを含有する培養上清液または反応液ろ液を、イオン交換樹脂処
理または活性炭処理または結晶化操作あるいはこれらの組合せの処理にかけ、こ
の処理により、高純度の L-エピー 2-イノソースを培養上清液または反応液ろ
液から回収することを特徴とする、請求項 1 に記載の L-エピー 2-イノソース
の製造方法。

【請求項 9】 ミオーイノシトールを L-エピー 2-イノソースへ変換でき
る変換能を有する微生物を水性媒質中でミオーイノシトールに作用させて、前記
ミオーイノシトールの L-エピー 2-イノソースへの変換により L-エピー 2-
イノソースを該水性媒質中に生成させ、これにより微生物菌体と L-エピー 2-

イノソースとを含有する反応液を取得し、次いで該反応液から菌体を除去してL-エピー-2-イノソースを含有する反応液ろ液を取得し、さらに得られたL-エピー-2-イノソース含有の反応液ろ液に適当な還元剤を直接に添加して該還元剤をL-エピー-2-イノソースに作用させてエピーイノシトールとミオーイノシトールを生成させることから成ることを特徴とする、エピーイノシトールの製造方法。

【請求項10】 請求項9記載のミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる変換能を有する微生物が細菌である請求項9に記載の方法。

【請求項11】 請求項9記載のミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる変換能を有する微生物がグラム陰性細菌である請求項9に記載の方法。

【請求項12】 請求項9記載のミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる変換能を有する微生物が、グラム陰性細菌であり、シュードモナダセア (Pseudomonadaceae) 科に属するキサントモナス (Xanthomonas) 属またはシュードモナス (Pseudomonas) 属の細菌、あるいはアセトバクテラセア (Acetobacteraceae) 科に属するアセトバクター (Acetobacter) 属またはグルコノバクター (Gluconobacter) 属の細菌、あるいはリゾビアセア (Rhizobiaceae) 科に属するアグロバクテリウム (Agrobacterium) 属の細菌、あるいはエンテロバクテリアセア (Enterobacteriaceae) 科に属するエルウィニア (Erwinia) 属、エンテロバクター (Enterobacter) 属、セラチア (Serratia) 属またはエルシニア (Yersinia) 属の細菌、あるいはパステウレアセア (Pasteurellaceae) 科に属するパステウレラ (Pasteurella) 属またはヘモフィルス (Haemophilus) 属の細菌から選ばれるグラム陰性細菌である請求項9に記載のエピー-2-イノシトールの製造方法。

【請求項13】 請求項9記載のミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる変換能を有する微生物が、キサントモナス (Xanthomonas) ・エスピーAB10119株 (FERM P-17382として寄託) あるいはシュードモナス (Pseudomonas) ・エスピーAB10215株 (FERM P-17804として寄託) あるいはエルウィニア (Erwinia) ・エスピーAB10

135株 (FERM P-17803として寄託) である請求項9に記載のL-エピー-2-イノシトールの製造方法。

【請求項14】 請求項9記載の、ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる変換能を有する微生物を、ミオーイノシトール並びに炭素源及び窒素源を含有する液体培地よりなる水性媒質中で好氣的に培養しながら、該微生物をミオーイノシトールに作用させて、得られた培養液中にL-エピー-2-イノソースを生成し且つ蓄積させて微生物菌体とL-エピー-2-イノソースとを含有する反応液として、培養液を取得する工程と、その培養液から該微生物の菌体を除去して、L-エピー-2-イノソースを含有する反応液ろ液として得られた培養上清液を取得する工程と、該培養上清液に直接にL-エピー-2-イノソースの還元のための還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加し、該還元剤をL-エピー-2-イノソースに作用させて還元する反応を行い、これによりエピーイノシトール及びミオーイノシトールを該反応液ろ液、すなわち該培養上清液内で生成する工程と、こうして得られたところの反応液、すなわち生成されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを含有する該培養上清液から、エピーイノシトールとミオーイノシトールを回収する工程と、回収されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを相互から分離する工程とからなる請求項9に記載の方法。

【請求項15】 請求項9記載のミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる変換能を有する微生物を、炭素源及び窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養して該微生物の培養液を取得し、さらに該培養液から該微生物の菌体を分離する工程と、こうして得られた微生物菌体を緩衝液または液体培地よりなる水性媒質中でミオーイノシトールと反応させて、L-エピー-2-イノソースを生成させる工程と、こうして得られたところの、該微生物菌体と生成されたL-エピー-2-イノソースとを含有する反応液から菌体を除去して、これにより、微生物菌体を除去されたがL-エピー-2-イノソースを含有する得られた反応液ろ液を取得する工程と、このL-エピー-2-イノソース含有の反応液ろ液に還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカ

リ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加し、該還元剤をＬ－エピー２－イノソースに作用させて還元する反応を行い、これによりエピーイノシトール及びミオーイノシトールを該反応液ろ液内で生成する工程と、こうして得られて、生成されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを含有する還元反応の反応液から、エピーイノシトールとミオーイノシトールを回収する工程と、回収されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを相互から分離する工程とからなる請求項９に記載の方法。

【請求項１６】 請求項１４または１５に記載の方法における還元剤を添加してＬ－エピー２－イノソースを還元剤で還元する工程を行う前に、Ｌ－エピー２－イノソースを含有する培養上清液または反応液ろ液よりなる水性媒質のｐＨを、８～１２の範囲のアルカリ性に予め調整する工程を行い、その後、Ｌ－エピー２－イノソースを含有するｐＨ８～１２の該水性媒質に、還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加して該還元剤をＬ－エピー２－イノソースに作用させて還元する反応を行い、これにより、副成されたミオーイノシトールの生成量よりもはるかに高い生成量でエピーイノシトールを生成させることを特徴とする、請求項１４または１５に記載の方法。

【請求項１７】 Ｌ－エピー２－イノソースを還元するのに用いられる還元剤は、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化メトキシホウ素ナトリウムまたはシアン化水素化ホウ素ナトリウムである請求項９に記載の方法。

【請求項１８】 用いる水性媒質は水であり、用いる還元剤が水素化ホウ素ナトリウムである請求項９に記載の方法。

【請求項１９】 ミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17382の受託番号で寄託されたキサントモナス・エスピーAB10119株。

【請求項２０】 ミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17804の受託番号で寄託されたシュードモナス・エスピーAB10215株。

【請求項 2 1】 ミオーイノシトールを L-エピー 2-イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所に F E R M P-1 7 8 0 3 の受託番号で寄託されたエルウィニア・エスピー A B 1 0 1 3 5 株。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

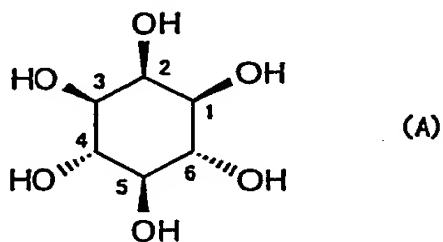
【発明の属する技術分野】

本発明は、安価なミオーイノシトール (myo-Inositol) を原料として用い、それ自体が生物活性を有して且つ医薬、等の合成の原料としても価値の高い L-エピー 2-イノソース (L-epi-2-Inosose) を、化学合成工程を経ず、微生物の作用下に一段階で製造する方法に関する。また本発明は L-エピー 2-イノソースを還元して、それ自体が生物活性を有し医薬品として有望なエピーイノシトール (epi-Inositol) を効率良く製造する方法に関する。

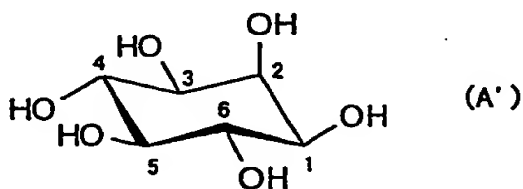
【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

ミオーイノシトールは次の平面式 (A)



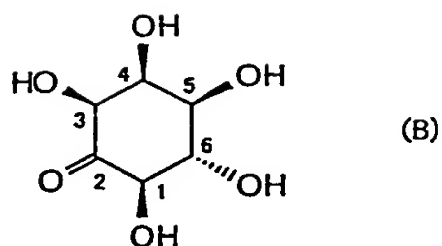
または次の立体構造式 (A')



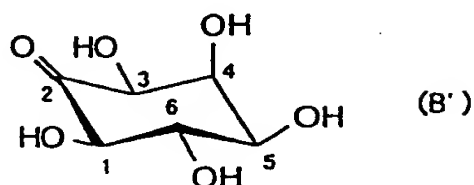
で表される天然に産する既知の物質である。

【 0 0 0 3 】

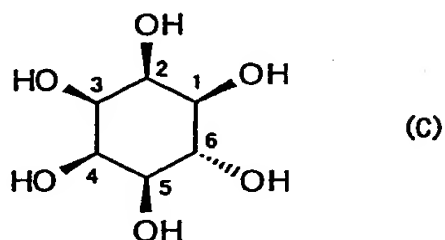
また、L-エピー 2-イノソースは次の平面式 (B)



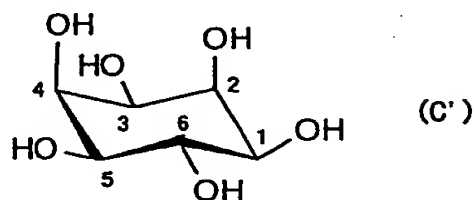
または次の立体構造式 (B')



で表される既知の物質である。さらに、エピーイノシトールは次の平面式 (C)



または次の立体構造式 (C')



で表される既知の化学合成物質である。エピーイノシトールはミオーイノシトールの立体異生体の一つである。

【0004】

イノソース (Inososes, 別名では Pentahydroxycyclohexanones または Alicyclic ketohexoses) は一般的にイノシトールの微生物的酸化 [A. J. Kluyver & A. Boezaardt: 「Rec. Trav. Chim.」 58 巻、956 頁 (1939)]、酵素的酸化 [L. Anderson 等: 「Arch. Biochem. Biophys.」 78 巻、518 頁 (1958)]、白金触媒を用いた空気酸化 [K. Heyns and H. Paulsen: 「Ch m. B

r.] 86巻、833頁(1953)]、硝酸等の酸化剤による酸化

[T. Posternak: 「Helv. Chim. Acta」19巻、1333頁(1936)]によって合成されることが知られている。

【0005】

イノシトールのうち、ミオーイノシトールの微生物的酸化あるいは酵素的酸化で生成するイノソースは、これまでシロイノソース(別名ミオーイノソース-2)が知られている[A. J. Kluyver & A. Boezaardt: 「Rec. Trav. Chim.」58巻、956頁(1939)、L. Anderson等: 「Arch. Biochem. Biophys.」78巻、518頁(1958)]のみで、ミオーイノシトールを酸化してL-エピー-2-イノソースを生成する微生物はこれまで報告されていない。

【0006】

L-エピー-2-イノソースは、D-キロイノシトール(DCIと略記される)の合成原料として有用である(米国特許第5,406,005号)。このDCIはインシュリン抵抗性糖尿病の治療薬として有用であり(WO90・10439号公報)、あるいは多嚢胞性卵巣症候群の改善薬として利用される[J. E. Nestler等: 「NEW Engl. J. Med.」340巻、1314頁(1999)]ことが期待されている。このL-エピー-2-イノソースの製法としては、1ミオーイノシトールの硝酸による酸化で生成するラセミ体のDL-エピー-2-イノソース((±)-エピー-2-イノソース)を、酸化白金触媒の存在下に水素で還元してエピーイノシトールを生成し、その後に細菌のアセトバクター・サブオキシダンス(*Acetobacter suboxydans*)によるエピーイノシトールの微生物的酸化を行うことにより、L-エピー-2-イノソースを合成する方法の報告がある[T. Posternak: 「Helv. Chim. Acta」29巻、1991頁(1946)]。また、2D-グルクロン酸を出発原料にして化学合成したグルコジアルドースをアシロイン縮合して生成する化合物の一つとしてL-エピー-2-イノソースが合成されるという報告がある(米国特許第5,406,005号)。

【0007】

イノシトールは、シクロエキサンから誘導される6価アルコールの総称であり、イノシトールには9種の立体異生体が存在する。天然産イノシトールにはミオ

ーイノシトール、D-キローイノシトール、L-キローイノシトール、ムコーイノシトール、シローイノシトールの5種が見出されている。その他のイノシトールにはエピーイノシトール、アローイノシトール、ネオーイノシトール、シスーイノシトールがあり、これら4種のイノシトールは非天然型の化学合成されたイノシトールである。非天然型のイノシトールのうち、エピーイノシトールはうつ病、不安症の改善薬としての利用が期待されている〔R. H. Belmaker等のPCT出願PCT/IL/00523号の国際公開明細書WO99/22727号及びR. H. Belmaker等：「Int. J. Neuropsychopharmacol.」1巻、31頁（1998）参照〕。

【0008】

このエピーイノシトールの製法としては、（1）ミオーイノシトールの硝酸による酸化で生成するラセミ体のD, L-エピー-2-イノソースを酸化白金触媒の存在下で水素で還元してエピーイノシトールを合成する方法〔T. Posternak：「Helv. Chim. Acta」29巻、1991頁（1946）〕と、（2）シクロヘキサジエンの2価アルコールをオスミウム酸で酸化してエピーイノシトールを合成する方法〔T. Tschamber等：「Helv. Chim. Acta」75巻、1052頁（1992）〕と、（3）テトラヒドロベンゾキノンに水素添加してエピーイノシトールを合成する方法（L. Odier：EP特願公開524082号公報）と、（4）ムコーイノシトールを適当に保護し、酸化、還元の組合せによりエピーイノシトールを合成する方法〔K. E. Espelie等：「Carbohydrate Res.」46巻、53頁（1976）〕がある。また、グルコースあるいはガラクトースのFerrier環化反応及び適当な還元剤での還元反応の組合せによりエピーイノシトールを合成する方法〔高橋等：「有機合成化学協会誌」58巻、120頁（2000）〕もある。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、これらL-エピー-2-イノソースの製造方法、およびエピーイノシトールの製造方法は、いずれも工業的規模で製造する方法としては、操作の煩雑さ、環境汚染あるいは経済性の面で問題があるので、従来法は全て必ずしも

満足し得るものではない。従って、工業規模で簡便に且つ効率良く L-エピー-2-イノソースを製造する新しい方法、及び簡便に効率良くエピーイノシトールを製造する新しい方法が要望されている。本発明の目的は、このような要望に合致して種々の利点を有する L-エピー-2-イノソース及びエピーイノシトールを効率よく製造できる新しい方法を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討を重ねてきた。その結果、安価に入手できるミオーイノシトールに対して、本発明者等により土壌から新たに分離した細菌の新しい菌株であるキサントモナス・エスビー AB10119 株を水性の媒質中で作用させると、式 (A) または (A') で表されるミオーイノシトールの 4 位の水酸基のみをほぼ選択的に酸化(または脱水素)できて式 (B) または (B') の L-エピー-2-イノソースが生成することを見出した。このイノソースを単離し、核磁気共鳴スペクトル装置、質量分析装置、旋光度計などにより機器分析を実施した結果、この物質は光学純度の高い L-エピー-2-イノソースであることが判明した。

【0011】

更に、ミオーイノシトールを L-エピー-2-イノソースに変換できる活性を有する微生物を広く自然界から探索したところ、グラム陰性細菌、例えばシュードモナダセア (Pseudomonadaceae) 科のキサントモナス (Xanthomonas) 属またはシュードモナス (Pseudomonas) 属の細菌；およびアセトバクテラセア (Acetobacteraceae) 科のアセトバクター (Acetobacter) 属またはグルコノバクター (Gluconobacter) 属の細菌；およびリゾビアセア (Rhizobiaceae) 科のアグロバクテリウム (Agrobacterium) 属の細菌；エンテロバクテリアセア (Enterobacteriaceae) 科のエルウィニア (Erwinia) 属、エンテロバクター (Enterobacter) 属、セラチア (Serratia) 属、エルシニア (Yersinia) 属の細菌；およびパステウレアセア (Pasteurellaceae) 科のパステウレラ (Pasteurella) 属またはヘモフィルス (Haemophilus) 属の細菌に属するグラム陰性細菌である分類学的に広範な範囲のグラム陰性細菌のうちに、上記のミオーイノシトールを酸化して L-エ

ピー2-イノソースへ変換できる活性または能力を有する菌株が存在することが明らかになった。これらの中でもミオーイノシトールを酸化してL-エピー2-イノソースへ変換できる高い活性または能力を有する菌株として、例えば、具体的には、上記に記載のキサントモナス・エスピー AB10119株があり、これ以外に、土壌から新たに本発明者らが分離した細菌の新しい菌株であるシュードモナス・エスピー AB10215株、あるいはエルウィニア・エスピー AB10135株があげられる。

【0012】

上記した知見に基づいて、L-エピー2-イノソースの新しい製造方法が後記の通り工夫された。すなわち、ミオーイノシトール並びに通常の炭素源及び窒素源を含有する液体培地、あるいは通常の炭素源を特に含有しないでミオーイノシトール（これの一部が炭素源となる）と窒素源（窒素源が有機窒素源である場合、これの一部も培養条件によっては炭素源になる）とを含有する液体培地中で上記のキサントモナス・エスピー AB10119株あるいはシュードモナス・エスピー AB10215株あるいはエルウィニア・エスピー AB10135株、等を好氣的に培養すると、これにより、得られた培養液中で、ミオーイノシトールからL-エピー2-イノソースを生成させ且つこれを蓄積するようにしてL-エピー2-イノソースを効率よく製造できることが知見された。また、L-エピー2-イノソースの上記の新しい製造方法では、培養液中に蓄積したL-エピー2-イノソースには、使用微生物の菌体の除去後に、陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂等のイオン交換樹脂処理あるいは活性炭処理あるいは結晶化操作により、あるいはこれら処理の組合せにより、高純度なL-エピー2-イノソースとして効率良く回収できることが知見された。

【0013】

さらに、本発明者等が別途の研究を行った結果、上記のように培養液中で生成および蓄積されたL-エピー2-イノソースを含む培養液から、菌体を除去し、そしてその後、得られた培養上清液に、直接に、適当な量の水素化ホウ素ナトリウムまたはこれと均等な水素化物の他の還元剤を添加して、培養上清液中でL-エピー2-イノソースに該還元剤を反応させる場合に、L-エピー2-イノソー

スがエピーイノシトールに効率よく還元されることが知見された。すなわち、培養上清液からＬ－エピー２－イノソースは単離されなくとも、培養上清液内で上記還元剤との反応によりＬ－エピー２－イノソースはエピーイノシトールに効率良く還元され得ることが見出された。

【 0 0 1 4 】

さらに、上記のキサントモナス・エスピー AB10119株に代表されるところの、ミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースに変換できる酸化能を有するグラム陰性細菌でミオーイノシトールを処理する手法、並びに生成されたＬ－エピー２－イノソースを単離せずに、Ｌ－エピー２－イノソースを適当な還元剤で処理してエピーイノシトールを生成し収得する手法について種々の実験を本発明者等は行った。その結果、多くの知見が得られた。それらの知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 5 】

従って、第１の本発明においては、ミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる変換能を有する微生物を、ミオーイノシトールに作用させて、前記ミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換させてＬ－エピー２－イノソースを生成することをから成ることを特徴とする、Ｌ－エピー２－イノソースの製造方法が提供される。

【 0 0 1 6 】

第１の本発明によるＬ－エピー２－イノソースの製造方法は、具体的には、以下に示す（Ａ）及び（Ｂ）の２つの実施方法で行うことができる。

【 0 0 1 7 】

実施方法（Ａ）は、上記のミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースに酸化できる変換能を有する微生物を、ミオーイノシトール並びに炭素源及び窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養し、その培養液中にＬ－エピー２－イノソースを生成蓄積させる工程と、得られた培養液から菌体を除去後、生成蓄積させたＬ－エピー２－イノソースを、得られた培養上清液から、イオン交換樹脂処理、活性炭処理または結晶化操作あるいはそれらの処理などの組合せにより、回収する工程とを含む方法である。

【0018】

実施方法（B）は、上記変換能を有する微生物を培養し、得られた培養物から該微生物の菌体を分離し、該菌体を、ミオーイノシトールを含む緩衝液または液体培地に加え、該緩衝液または液体培地中でミオーイノシトールと反応させ、得られた反応液中にL-エピー-2-イノソースを生成させる工程と、反応液に生成蓄積させたL-エピー-2-イノソースを反応液からイオン交換樹脂処理、活性炭処理または結晶化操作あるいはこれら処理の組合せにより、回収する工程を含む方法である。

【0019】

第1の本発明の方法において使用する微生物は、ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースに変換する能力を有する微生物であればいずれの菌株でも良い。

【0020】

具体的に例示すると、前述したようにミオーイノシトールからL-エピー-2-イノソースを生産できる菌には多種の細菌が存在する。例えば本発明者らが分離した前記のAB10119株、AB10215株、AB10135株は本発明方法に最も有効に使用される細菌の例である。前記の3種の菌株の菌学的性質を後記の表1a、表1b、表1c、表1dに示した。

【0021】

尚、前記の3種の菌株の同定の当たっては、新細菌培地学講座（第2版、近代出版）、医学細菌同定の手引き（第2版、近代出版）、細菌学実習提要（丸善）に準じて、同定のための実験を行い、得られた実験結果をBergey's Manual of Systematic Bacteriology VOL. 1（1984）を参考に評価して菌株の同定を行った。

【0022】

[表1a]

| 形態的特徴 | AB10119株 | AB10215株 | AB10135株 |
|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| (1)細胞形態: | 桿菌で大きさは0.4~0.6×0.6~0.6μm。多形性がある。 | 桿菌で、大きさは0.3~0.5×0.6~0.6μm。多形性がある。 | 桿菌で、大きさは0.4~0.6×0.8~2.0μm。多形性は無い。 |
| (2)運動性: | - | - | - |
| (3)普通寒天培地上での生育状態: | 生育は中程度。コニ形態は円形、平滑で光沢がある。色調は黄土色~黄色。 | 生育は旺盛。コニ形態は円形、平滑で光沢がある。色調は黄土色。 | 生育は微量。コニ形態は円形、平滑で光沢がある。色調は乳白色。 |
| (4)最少培地(炭素源グルコース)での生育状態 | 生育は微量。 | 生育は旺盛。 | 生育せず。 |
| 生理生化学的性状 | | | |
| (1)グーザ染色: | - | - | - |
| (2)OFテスト | 0 (Oxidative) | 0 (Oxidative) | F (Fermentative) |
| (3)好気条件での生育: | + | + | + |
| (4)嫌気条件での生育: | - | - | +(weak) |
| (5)生育温度: | | | |
| 8℃ | - | - | - |
| 10℃ | - | - | + |
| 13℃ | + | + | + |
| 17℃ | + | + | + |
| 21℃ | + | + | + |
| 37℃ | + | + | + |
| 40℃ | + | + | - |
| 42℃ | - | - | - |
| 47℃ | - | - | - |
| (6)食塩耐性: | | | |
| 0% | + | + | + |
| 2% | + | + | + |
| 5% | - | - | + |
| 10% | - | - | - |

【0023】

【表 1 b】

| 生理生化学的性状 | | AB10119株 | AB10215株 | AB10135株 |
|------------------------|--|----------------|----------------|----------|
| (7) 生育pH : | | | | |
| pH3 | | - | - | - |
| pH4 | | - | - | + |
| pH5 | | + | + | + |
| pH6 | | + | + | + |
| pH7 | | + | + | + |
| pH8 | | + | + | + |
| pH9 | | +(weak) | +(weak) | + |
| pH10 | | - | - | +(weak) |
| (8) 色素の産生 : | | | | |
| マニトール酵母寒天培地(不溶性色素の検出用) | | 菌体が薄い黄土色～黄色に着色 | 菌体が僅かに黄色に着色 | - |
| King培地(水溶性色素の検出用) | | 寒天中に薄い黄色の色素を産生 | 寒天中に薄い黄色の色素を産生 | - |
| (9) クロロム・ヒン・ゼ' の産生 | | - | - | - |
| (10) カラ・ゼ' の産生 : | | + | + | + |
| (11) 硝酸塩の還元性 | | - | + | + |
| (12) 硫化水素の産生 : | | - | - | - |
| (13) アミノ酸の産生 : | | + | - | + |
| (14) トリプトファンの液化 | | + | + | + |
| (15) Tween 80 の分解 : | | + | + | - |
| (16) イントールの産生 : | | - | - | - |
| (17) アミノ酸の利用性 : | | - | - | - |
| (18) ONPG の分解性 : | | + | + | + |
| (19) エステルの分解性 : | | + | + | + |

【0024】

【表1c】

| 生理生化学的性状 | AB10119株 | AB10215株 | AB10135株 |
|-------------------------|----------|----------|----------|
| (20)デキストロース利用性： | + | + | - |
| (21)グルコース利用性： | + | + | - |
| (22)アミノ酸に対するデカルボキラーゼ活性： | | | |
| L-リジン | - | - | - |
| L-アラニン | - | - | - |
| L-イソロイシン | - | - | - |
| (23)尿素分解性： | - | - | - |
| (24)アミノ酸分解性： | - | - | - |
| (25)リゾチーム： | 凝固せず | 凝固せず | 凝固せず |
| (26)澱粉の分解： | - | - | - |
| (27)色素及び薬剤感受性試験： | | | |
| 0.01%チロシン | + | + | + |
| 0.01%オニオン | + | + | - |
| 0.01%酢酸鉛 | - | - | - |
| (28)各種糖類からの酸の生成： | | | |
| グルコース | + | + | + |
| キシロース | + | + | + |
| マンノース | + | + | + |
| アビチン | + | + | + |
| フルクトース | + | + | + |
| サトウキビ | + | + | + |
| ラクトース | - | - | - |
| アミノ酸 | - | - | + |
| シュクロース | - | - | + |
| アミノ酸 | - | - | - |
| アミノ酸 | - | - | - |

【0025】

| [表 1 d] | | AB10119株 | AB10215株 | AB10135株 |
|----------------------|----|----------|----------|----------|
| 生理生化学的性状 | | | | |
| (28)各種糖類からの酸の生成: | | | | |
| ソレイトール | - | - | - | - |
| ガラクトース | + | + | + | + |
| トレハロース | - | - | - | - |
| セロトース | + | + | + | + |
| イソリッ | - | - | - | - |
| スチロトール | - | - | - | - |
| サリッ | + | + | + | + |
| ラクトース | - | - | - | - |
| グリセロール | - | - | - | - |
| アラニン | - | - | - | - |
| α-メチル-γ-ブチロース | - | - | - | - |
| (29)炭素源の酸化性: | | | | |
| グルコース | + | + | + | + |
| セロトース | + | + | + | + |
| アラニン | + | + | + | + |
| ラクトース | + | + | + | + |
| トレハロース | + | + | + | + |
| ガラクトース | + | + | + | + |
| D-7H/トース | + | + | + | + |
| 3-イソトール | - | - | - | - |
| サリッ | - | - | - | - |
| レヒスチン | + | + | + | + |
| レグルタミン酸 | + | + | + | + |
| グリッ | - | - | - | - |
| パントン酸 | - | - | - | - |
| アセト | - | - | - | - |
| アセト | - | - | - | - |
| (30)ユビキノンの分子種 | Q8 | Q8 | Q8 | Q8 |
| (31)DNAのGC含量 (HPLC法) | 68 | 68 | 68 | 50 |

【0026】

AB10119株の主な菌学的性状は、次のとおりである。本菌株はコロニー

が黄色の色素を帯びるグラム陰性の桿菌で、大きさは $0.4 \sim 0.6 \times 0.6 \sim 4.0 \mu\text{m}$ 。また、本菌株はカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性であり、グルコースを好氣的に分解し酸を生成する。最少培地での生育は悪く、メチオニンを添加すると良好な生育状態となる。硝酸塩の還元性は無く、0.01%のメチルグリーン及びチアニンに感受性であった。細胞のユビキノ分子の種はQ8で、DNAのGC含量は68%であった。

【0027】

これらの菌学的性質を総合して、AB10119株はキサントモナス(*Xanthomonas*)属に属する菌株であると判断した。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology VOL. 1 (1984) 199頁~210頁によると、キサントモナス属細菌には5種のスペシーズ(キサントモナス・カンペストリス; キサントモナス・フラガリアエ; キサントモナス・アルブリネンス; キサントモナス・アキシノポディス; キサントモナス・アメリザ)が知られている。AB10119株の菌学的性状を上記の既知のスペシーズと比較検討した結果、AB10119株はキサントモナス・カンペストリスに最も近縁の種とであると考えられた。しかし、本菌株の菌学的性質はキサントモナス・カンペストリスに完全には一致しなかったため、本AB10119株を公知のものと区別するため、キサントモナス・エスピー AB10119株と命名し、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERMP-17382として寄託した(寄託日は1999年5月7日)。

【0028】

また、AB10215株の主な菌学的性状は、次のとおりである。本菌体はコロニーが淡黄色の色素を帯びるグラム陰性の桿菌で、大きさは $0.3 \sim 0.5 \times 0.6 \sim 6.5 \mu\text{m}$ 。また本菌株はカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性であり、グルコースを好氣的に分解し酸を生成する。最少培地での生育は良好で硝酸塩の還元性を有する。0.01%のメチルグリーン及びチアニンに感受性であった。細胞のユビキノ分子の種はQ8で、DNAのGC含量は68%であった。

【0029】

これらの菌学的性質を総合すると、AB10215株はBergey's Manual of Systematic Bacteriology VOL. 1 (1984) 140頁~199頁に記載されて

いる、シュードモナス・マルトフィリアに最も近縁な種であると考えられる。しかし、AB10215株は、その菌学的性質においてシュードモナス・マルトフィリアに完全には合致しなかったので、本菌株を公知のものと区別するため、シュードモナス・エスピー AB10215と命名し、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17804として寄託した（寄託日2000年3月31日）。

【0030】

一方、AB10135株の主な菌学的性状は、次のとおりである。本菌株はコロニーが乳白色の色素を帯びるグラム陰性の桿菌で、大きさは $0.4 \sim 0.6 \times 0.8 \sim 2.0 \mu\text{m}$ 。本菌株はグルコースを好氣的・嫌氣的のいずれの条件でも分解し酸を生成するが、好氣的条件での生育に比べて嫌氣的条件での生育は非常に悪い。また、本菌株はカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性である。普通寒天培地での生育は微量であるが、5%シュクロースを添加すると非常に旺盛な生育を示す。細胞のユビキノンの種はQ8で、DNAのGC含量は50%であった。

【0031】

これらの菌学的性質を総合して、AB10135株はエルウィニア(Erwinia)属に属する菌株であると判断した。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology VOL.1 (1984) 469頁～476頁によると、エルウィニア属細菌は15種に分類されているが、AB10135株はいずれの種とも、その菌学的性質において完全には合致しなかった。従って、AB10135株を公知のものと区別するため、エルウィニア・エスピー AB10135と命名し、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17803として寄託として寄託した（寄託日は2000年3月31日）。

【0032】

以下に、第1の本発明の方法の前記した実施方法(A)～(B)をより詳しく説明する。

【0033】

実施方法(A)では、ミオーイノシトールならびに炭素源および窒素源を含む液体栄養培地で、ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースに変換できる

変換能を有する微生物を好氣的に培養し、その培養液中に、L-エピー-2-イノソースを生成蓄積させる工程が行われる。

【0034】

ここに用いる液体培地の組成は、目的を達する限り何ら特別の制限はない。用いる液体培地は、L-エピー-2-イノソースへの変換原料であるミオーイノシトールを含み、これに加えて、炭素源、窒素源、有機栄養源、無機塩類等を含有する培地であればよい。合成培地または天然培地のいずれも使用できる。用いる液体培地は、ミオーイノシトールを0.1%~40%、より好ましくは20~30%含有し、炭素源としては、グルコース、シュークロース、マルトースあるいは澱粉を0.1%~20%、より好ましくは0.5~5%を含有し、また窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムあるいは尿素等を0.01%~5.0%、好ましくは0.5%~2.0%含有するのが望ましい。その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、マンガン、亜鉛、鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成することができる無機塩類を培地中に添加することが有効である。得られる培養液中の水素イオン濃度はpH4~10、好ましくはpH5~9に調整しながら、菌を培養すると、効率よくL-エピー-2-イノソースを生成できる。

【0035】

菌の培養条件は、用いた菌株や培地の種類によっても異なるが、培養温度は5~40℃、好ましくは20~37℃であり、また、培養は液体培地を振とうしたり、液体培地中に空気を吹き込むなどして好氣的に行えば良い。培養期間は、培養液中にミオーイノシトールが完全に消失し、且つ生成されたL-エピー-2-イノソースが最大の蓄積量を示すまで行えば良く、通常1~14日、好ましくは3~10日である。L-エピー-2-イノソースを含む培養液が得られる。

【0036】

培養液から目的のL-エピー-2-イノソースを採取する方法は、培養液から通常の水溶性中性物質を単離精製する一般的な方法を応用することができる。すなわち、L-エピー-2-イノソースを含む培養液から菌体を除去した後、培養上清

液を活性炭やイオン交換樹脂等で処理することにより、L-エピー-2-イノソース以外の不純物を培養上清液からほとんど除くことができる。しかし、イオン交換樹脂処理には、強塩基性陰イオン交換樹脂の OH^- 型はL-エピー-2-イノソースを化学変化させるので使用することはできない。その後、活性炭またはイオン交換樹脂で処理された培養上清液から、L-エピー-2-イノソースを結晶化および必要に応じて再結晶する方法等を用いることにより、目的生成物を単離することができる。前記の培養上清液からL-エピー-2-イノソースを回収するためには、より具体的には、L-エピー-2-イノソースが蓄積、含有された培養上清液を、不望成分の除去の目的で強酸性陽イオン交換樹脂、例えばデュオライト(登録商標)C-20(H^+ 型)を充填したカラムに通過させて、通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集め、先に得られた通過液と洗浄液を合併し、その合併された溶液を弱塩基性陰イオン交換樹脂、例えばデュオライト(登録商標)A368S(遊離塩基型)を充填したカラムに通過させ、通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を合併して、L-エピー-2-イノソースを含むがそれ以外の不純物をほとんど含まない水溶液を取得する。この水溶液を濃縮して、得られたL-エピー-2-イノソースの濃厚溶液に、エタノールの適当量を加え、室温または低温で一晩放置すると、純粋なL-エピー-2-イノソースの結晶を晶出できる。

【0037】

第1の本発明方法の前記した実施方法(B)では、所望の変換能を有する微生物を培養し、得られた培養物から該微生物の菌体を分離し、該菌体を、ミオーイノシトールを含む緩衝液または液体培地に加え、該緩衝液または液体培地中でミオーイノシトールと反応させ、得られた反応液中にL-エピー-2-イノソースを生成させる工程が行われる。

【0038】

上記の工程で用いる菌体としては、実施方法(A)により得た培養液から分離して集めた菌体を用いてもよく、また、前記微生物を別途の工程で適当な培養条件で培養して得た菌体を用いてもよい。集菌は、培養液を遠心分離、濾過等にか

けて菌体を分離する公知の方法により行えばよい。

【0039】

ミオーイノシトールと菌体を反応させるための反応媒質としては、液体培地または緩衝液が用いられる。液体培地としては、実施方法（A）において用いたものと同様の組成のものを用いてもよい。また別途に前記微生物を培養し後に、その培養液から菌体を除去した培養上清液よりなる液体培地をそのまま用いてもよい。緩衝液としては、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド（Good's）のCHES緩衝液等を10～500mM、好ましくは20～100mMの濃度で用いればよい。緩衝液または液体培地にかかれたミオーイノシトール溶液中のミオーイノシトールの当初の濃度は0.1～40%（重量）程度とするのが好ましい。

【0040】

ミオーイノシトールと菌体との反応条件は、菌株や培地、緩衝液の種類によって異なるが、反応温度は5～60℃、好ましくは10～45℃であり、反応時間は1～50時間、好ましくは3～48時間である。液体培地または緩衝液のpHは2～10、好ましくは3～9である。

反応終了後に、得られた反応液からの目的物質を単離する方法は実施方法（A）と同様に行えばよい。

【0041】

第2の本発明においては、ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる変換能を有する微生物を水性媒質中でミオーイノシトールに作用させて、前記ミオーイノシトールのL-エピー-2-イノソースへの変換によりL-エピー-2-イノソースを該水性媒質中に生成させ、これにより微生物菌体とL-エピー-2-イノソースとを含有する反応液を取得し、次いで該反応液から菌体を除去してL-エピー-2-イノソースを含有する反応液ろ液を取得し、さらに得られたL-エピー-2-イノソース含有の反応液ろ液に適当な還元剤を直接に添加して該還元剤をL-エピー-2-イノソースに作用させてエピーイノシトールとミオーイノシトールを生成させることから成ることを特徴とする、エピーイノシトールの製造方法が提供される。

【0042】

第2の本発明の方法は、具体的には、以下に示す(C)、(D)及び(E)の3つの実施方法で行うことができる。

【0043】

第2の本発明方法の実施方法(C)は、ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる変換能を有する微生物を、第1の本発明方法の実施方法(A)記載の方法と同様な要領により、ミオーイノシトール並びに炭素源及び窒素源を含有する液体培地よりなる水性媒質中で好氣的に培養しながら、該微生物を培養液中でミオーイノシトールに作用させて、得られた培養液中にミオーイノシトールのL-エピー-2-イノソースへの変換により、L-エピー-2-イノソースを生成し且つ蓄積させて培養液を収得する工程(第1工程)と、反応液として得られた培養液から該微生物の菌体を除去して、その後、得られたL-エピー-2-イノソースを単離せずに、L-エピー-2-イノソースを含有する反応液ろ液として得られた培養上清液を収得する工程(第2工程)と、該培養上清液に対して直接に還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加し、該還元剤でL-エピー-2-イノソースを還元する反応を行い、これによりエピーイノシトール及びミオーイノシトールを該培養上清液内で生成する工程(第3工程)と、こうして得られたところの還元反応の反応液、すなわち生成されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを含有する培養上清液から、エピーイノシトールとミオーイノシトールを回収する工程(第4工程)と、回収されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを相互から分離する工程(第5工程)とからなる方法である。

【0044】

第2の本発明方法の実施方法(D)は、ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる変換能を有する微生物を第1の本発明方法の実施方法(B)記載の方法と同様な要領により、炭素源及び窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養して該微生物の培養液を収得し、さらに該培養液から該微生物の菌体を分離する工程(第1工程)と、こうして得られた微生物菌体を水性の緩衝液または液体培地よりなる水性媒質中でミオーイノシトールと反応させて、L-エピー-2-イノソースを生成させる工程(第2工程)と、こうして得られたところの、

該微生物菌体と生成されたL-エピー-2-イノソースとを含有する反応液から菌体を除去して、これにより、微生物菌体を除去されたL-エピー-2-イノソースを含有する得られた反応液ろ液を収得する工程（第3工程）と、この反応液ろ液に還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加し、該還元剤をL-エピー-2-イノソースに作用させて還元する反応を行い、これによりエピーイノシトール及びミオーイノシトールを該反応液ろ液内で生成する工程（第4工程）と、生成されたエピーイノシトール及びミオーイノシトールを含有するその還元反応の反応液から、エピーイノシトールとミオーイノシトールを回収する工程（第5工程）と、回収されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを相互から分離する工程（第6工程）とからなる方法である。

【0045】

第2の本発明方法の実施方法（E）では、上記の実施方法（C）及び（D）における還元剤を添加してL-エピー-2-イノソースを還元剤で還元する工程を行う前に、L-エピー-2-イノソースを含有する培養上清液または反応液濾液よりなる水性媒質のpHを、8～12の範囲のアルカリ性に予め調整する工程を行い、その後、L-エピー-2-イノソースを含有するpH8～12の水性媒質に還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加して該還元剤をL-エピー-2-イノソースに作用させて還元する反応を行い、これにより、副成されたミオーイノシトールの生成量よりもはるかに高い生成量でエピーイノシトールを生成させるようにして、エピーイノシトールが製造される。

【0046】

第2の本発明方法で使用される微生物は、第1の本発明方法で用いられたところの、ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる変換能を有する微生物と同じであることができる。

【0047】

以下に、第2の本発明の方法の前記した実施方法（C）～（E）をより詳しく説明する。

【0048】

第2の本発明方法の実施方法(C)では、ミオーイノシトールを含む液体栄養培地に、変換能を有する微生物を接種して好氣的に培養することにより、培養液中にL-エピー-2-イノソースを生成蓄積させる第1工程と、培養液から微生物菌体を除去し、その後に培養上清液からL-エピー-2-イノソースを単離せず、適当な還元剤を添加し、還元反応を行う第2工程と、こうして得られた還元反応液から生成されたエピーイノシトールを回収する第3工程とが行われる。

【0049】

すなわち、第2の本発明方法の実施方法(C)において、所望の変換能を有する微生物をミオーイノシトール含有の液体培地で培養しながら培養液中にL-エピー-2-イノソースを生成、蓄積させる第1工程が先ず行われるが、この第1工程は、第1の本発明方法の実施方法(A)の第1工程と全く同様に行うことができる。

【0050】

実施方法(C)の第2工程では、第1工程で得られた培養液から菌体を除去してL-エピー-2-イノソースを含有する培養上清液を取得する工程を行う。その後、第3工程では、得られた培養上清液に直接に還元剤として水素化物を添加して還元反応を行う。これによって、培養上清液内でL-エピー-2-イノソースからエピーイノシトール及びミオーイノシトールが生成される。使用される還元剤は、水系中でL-エピー-2-イノソースをエピーイノシトールに還元できる還元剤として、例えば、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化トリメトキシホウ素ナトリウム、シアン化水素化ホウ素ナトリウムであるのが望ましい。還元反応は0℃～室温で行う。L-エピー-2-イノソースの消失した時点または反応生成物の生成量が適当になった時点で還元反応を終了する。これによって、生成されたエピーイノシトール及びミオーイノシトールを含有する培養上清液が還元反応の反応液として得られる。

【0051】

ここで得られた還元反応の反応液である培養上清液から、エピーイノシトール及びミオーイノシトールを回収する第4の工程を次に行う。この第4の回収工程

では、エピーイノシトール及びミオーイノシトールを含有する培養上清液を、不望成分の除去の目的で強酸性陽イオン交換樹脂、例えばデュオライト（登録商標）C-20（ H^+ 型）を充填したカラムに通過させ、通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を合併し、その合併された溶液を弱塩基性陰イオン交換樹脂、例えばデュオライト（登録商標）A113（ OH^- 型）を充填したカラムに通過させ、通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を合併して、エピーイノシトール及びミオーイノシトールを含みそれ以外の不純物をほとんど含まない水溶液を取得するのが好ましい。

【0052】

実施方法（C）の最終（第5）工程では、先の第4工程で回収されたエピーイノシトール及びミオーイノシトールの水溶液からエピーイノシトールとミオーイノシトールを別々に分離する。この分離のためには、前記のエピーイノシトールとミオーイノシトールの水溶液を減圧下に濃縮し、その濃縮液を強塩基性陰イオン交換樹脂、例えばアンバーライト（登録商標）CG-400（ OH^- 型）を充填したカラムに通過させ、その後このカラムに脱イオン水を通過させることによって該カラムを溶出し、これによって、ミオーイノシトールを主として含有する溶出液画分と、目的とするエピーイノシトールを含有する溶出液画分とを別々に得ることが好ましい。このエピーイノシトールを含む水溶液を濃縮して、得られたエピーイノシトールの濃厚溶液に、エタノールの適当量を加え、室温または低温で一晩放置すると、純粋なエピーイノシトールの結晶を晶出できる。

【0053】

なお、上記の還元終了後に生成されたエピーイノシトールを含む培養上清液を、複数のイオン交換樹脂カラムで処理する第3工程では、エピーイノシトール及びミオーイノシトールを含有するが、その他の不純成分をほとんど含有しない水溶液が得られる。このエピーイノシトールとミオーイノシトールの水溶液を濃縮し、得られた濃縮液を、スルホン酸基を交換基とするスチレン重合体よりなる強酸性陽イオン交換樹脂（ Ca^{2+} 型）、例えばダイヤイオン（登録商標）UBK 520M（ Ca^{2+} 型）のカラムに通して、カラムにエピーイノシトール及びミ

オーイノシトールを吸着させ、ついでカラムを脱イオン水で溶出する場合には、ミオーイノシトールからエピーイノシトールを効率よく分離できることが本発明者等によって見出されている。

【 0 0 5 4 】

第2の本発明方法の実施方法(D)では、液体栄養培地で所望の変換能を有する微生物を接種して好氣的に培養し、得られた培養液から微生物菌体を分離することにより、該菌体を大量に収得する第1工程と、こうして得られた該菌体を、緩衝液あるいは液体培地よりなる水性媒質中で溶解させたミオーイノシトールに作用させて、L-エピー-2-イノソースを生成蓄積させる第2工程と、反応液から菌体を除去してL-エピー-2-イノソースを含有する反応液ろ液を得る第3工程と、L-エピー-2-イノソースを単離せず、該反応液ろ液に適当な還元剤を添加し、還元反応を行う第4工程と、こうして得られた還元反応液から、生成されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを回収する第5工程と、回収されたエピーイノシトールをミオーイノシトールから分離する第6工程とが行われる。

【 0 0 5 5 】

この実施方法(D)の第1工程では、使用される変換能を有する微生物を、微生物の培養に常用される液体培地で好氣的に培養し、得られた培養液から該微生物の菌体を分離する。この様に分離された菌体を実施方法(D)の第2工程で使用する。菌体としては、実施方法(A)により得た培養液から菌体を分離して集めた菌体を用いても良い。また、前記の使用微生物を別途の工程により適当な培養条件で培養して得た菌体を用いてもよい。菌体の分離と集菌は、培養液を遠心分離、濾過等の公知の手段にけることにより行えば良い。

【 0 0 5 6 】

実施方法(D)の第2工程において、菌体をミオーイノシトールに反応させるための液体反応媒質としては、緩衝液または液体培地よりなる水性媒質が用いられる。液体培地としては、実施方法(A)で用いたものと同様のものを用いても良い。緩衝液としては、リン酸緩衝液、グッド(Good's)のCHES緩衝液等を10~500mM、好ましくは20~100mMの濃度で用いれば良い。ここで

用いた水性の反応媒質にとかしたミオーイノシトールの濃度は、0.1～30% (重量)の程度とするのが望ましい。菌体とミオーイノシトールとの反応条件は、使用菌株や使用された反応媒質の緩衝液または液体培地の種類によって異なる。反応温度は5～60℃、好ましくは10～45℃であり、反応時間は1～50時間、好ましくは3～48時間である。水性反応媒質として用いられる緩衝液または液体培地のpHは2～10、好ましくは3～9である。該第2工程で微生物菌体をミオーイノシトールと反応させると、L-エピー-2-イノソースを含有する反応液が得られる。

【0057】

実施方法(D)の第3工程では、第2工程で得られたL-エピー-2-イノソース含有反応液から遠心分離、濾過等の公知の手段により菌体を除去する。次の第4工程では、得られた菌体を除かれた反応液濾液に還元剤としての水素化物を添加して、L-エピー-2-イノソースの還元反応を行い、これによりエピーイノシトール及びミオーイノシトールを生成する。この還元反応は、実施方法(C)の第2工程で説明したと同じ要領で行いうる。

【0058】

次いで、エピーイノシトール及びミオーイノシトールを含有する還元反応液からエピーイノシトール及びミオーイノシトールをそれらの水溶液として回収する第5工程を行う。その後に、エピーイノシトール及びミオーイノシトールを含有する水溶液からエピーイノシトールを取得する第6工程を行う。これら第5及び第6工程は、先に実施方法(C)の第4工程および第5工程で説明した手法と同様に実施できる。

【0059】

さらに第2の本発明方法の実施方法(E)においては、第2の本発明方法の実施方法(C)の第2工程ならびに実施方法(D)の第4工程を行うに先立ち、すなわちL-エピー-2-イノソースが蓄積含有された前記の培養上清液あるいは反応液濾液にアルカリ金属水素化物型の還元剤を添加し還元反応を行う工程に先立ち、還元剤を添加する前に、予め前記の培養上清液あるいは反応液濾液を、水酸化ナトリウムあるいは水酸化カリウムあるいは炭酸ナトリウムあるいは炭酸カリ

ウムの添加によりpH8-11、望ましくはpH9-10に調整して置く工程を行い、そして、その後に還元剤を添加し還元反応を行うのである。このようにアルカリ性に反応媒質のpHを調整することにより、pHを未調整（通常pH5-7）で還元反応を行う場合（通常エピーイノシトール6-7部に対しミオーイノシトール3-4部が生成する）と比較すると、生成するエピーイノシトールの量が1.3-1.5倍に増加し、副成するミオーイノシトールの量が1/2-1/4に減少することが本発明者の別途の研究で知見された。実施方法（E）によると、pH8-11の水性媒質中で、L-エピー-2-イノソースを水素化物で還元することによって、副成されたミオーイノシトールの生成量よりもはるかに高い生成量でエピーイノシトールを生成させることができる。

【0060】

前記のAB10119株、AB10215株およびAB10135株は新規な微生物であって、ミオーイノシトールからL-エピー-2-イノソースを生産できる有用性を有する。従って、第3の本発明においては、ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17382の受託番号で寄託されたキサントモナス・エスピーAB10119株が新規微生物として提供される。

【0061】

また、第4の本発明においては、ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17804の受託番号で寄託されたシュードモナス・エスピーAB10215株が新規微生物として提供される。

【0062】

さらに、第5の本発明においては、ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17803の受託番号で寄託されたエルウィニア・エスピーAB10135株が新規微生物として提供される。

【0063】

【発明の効果】

第 1 の本発明および第 2 の本発明によれば、医農薬合成原料として有用な純度の高い L-エピ-2-イノソースと医薬として有用なエピ-イノシトールとがそれぞれに工業生産規模で安価に製造することができる。

【 0 0 6 4 】

【発明の実施の形態】

以下に本発明を下記の実施例について具体的に説明する。

実施例 1

(a) 実施方法 (A) による L-エピ-2-イノソースの製造例 (1)

(1) L-エピ-2-イノソースの生成 (第 1 例)

ミオーイノシトール 12.0% (360g)、酵母エキス 1.2%、
(NH₄)₂SO₄ 0.1%、K₂HPO₄ 0.7%、KH₂PO₄ 0.2%、MgSO₄・7H₂O 0.01%を含む pH7 の液体培地 3 リットルを、100ml ずつ 500ml 容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピー AB10119 株 (FERM P-17382) を接種し、27℃ で 3 日間振とう培養した。培養液を遠心分離 (8,000rpm、20 分間) し、培養上清液を得た。

【 0 0 6 5 】

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより下記の条件で分析した。その結果、培養上清液中には L-エピ-2-イノソースが 66mg/ml (変換率 55.6%) の濃度で生成していることがわかった。この時の培養上清液中にミオーイノシトールは検出されなかった。

【 0 0 6 6 】

なお、上記の L-エピ-2-イノソースの変換率は、次の計算式により求めた。

【 0 0 6 7 】

変換率 (%) = [培養上清液 1ml 中の L-エピ-2-イノソースのモル数 ÷ 液体培地 1ml 中のミオーイノシトールのモル数]

高速液体クロマトグラフィーの分析条件は以下の通りである。

カラム : Wakosil 5NH₂ : 4.6 × 250mm

カラム温度 : 40℃

検出器 : RI DETECTOR ERC-7515A (ERMA CR. INC.)

注入量 : 20 μ l

溶媒 : アセトニトリル-水=4:1

溶出時間 : L-エピー-2-イノソース ; 6.7分

【0068】

(2) L-エピー-2-イノソースの生成 (第2例)

ミオーイノシトール 25.0% (250 mg/ml)、グルコース 1.0%、酵母エキス 0.7%を含むpH未調整の液体培地400mlを、100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピーAB10119株 (FERM P-17382) を接種し、27℃で5日間振とう培養した。培養液を遠心分離 (8,000 rpm、20分間) し、培養上清液を得た。

【0069】

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより前記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはL-エピー-2-イノソースが247 mg/ml (変換率99.9%)の濃度で生成していることがわかった。この時の培養上清液中にミオーイノシトールは検出されなかった。

なお、上記のL-エピー-2-イノソースの変換率は、前記の計算式により求めた。

【0070】

(3) L-エピー-2-イノソースの生成 (第3例)

ミオーイノシトール 4.0% (40 mg/ml)、酵母エキス 0.2%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%、 K_2HPO_4 0.7%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%を含むpH7の液体培地100mlを500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。この三角フラスコにエルウィニア・エスピーAB10135株 (FERM P-17803) を接種し、27℃で5日間振とう培養した。培養液を遠心分離 (8,000 rpm、20分間) し、培養上清液を得た。

【0071】

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより前記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはL-エピー-2-イノソースが22 mg/ml (変換率55.6%)の濃度で生成していることがわかった。この時の培養上清液中にミオ-イノシトールは検出されなかった。

なお、上記のL-エピー-2-イノソースの変換率は、前記の計算式により求めた。

【0072】

(4) L-エピー-2-イノソースの生成 (第4例)

ミオ-イノシトール 25.0% (250 mg/ml)、グルコース 1.0%、酵母エキス 0.7%を含むpH未調整の液体培地100 mlを、500 ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにシュドモナス・エスピーAB10215株 (FERM P-17804) を接種し、27℃で5日間振とう培養した。培養液を遠心分離 (8,000 rpm、20分間) し、培養上清液を得た。

【0073】

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより前記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはL-エピー-2-イノソースが244 mg/ml (変換率98.7%)の濃度で生成していることがわかった。この時の培養上清液中にミオ-イノシトールは検出されなかった。

【0074】

(b) L-エピー-2-イノソースの回収と単離

上記の実施例1 (2) で得た培養上清液を、強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト (登録商標) C-20 (H⁺型) 80 mlを充填したカラム (内径2 cm、長さ30 cm) に通過させ、その後このカラムに80 mlのイオン交換水 (脱イオン水) を通過させて洗浄した。この通過液及び洗浄液を、合併して、合併された溶液を弱塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト (登録商標) 368 S (遊離塩基型) 160 mlを充填したカラム (内径3 cm、長さ30 cm) に通過させ、その後このカラムに160 mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。

こうして得られた通過液及び水洗浄液を合併して得られた水溶液中には、上記 L-エピー-2-イノソースが含有される以外に、不純物はほとんど存在していなかった。

【0075】

上記の合併により得た水溶液を減圧下で 200 ml まで濃縮した。その濃縮液にエタノールを 3 倍量加え 5℃で一晩放置したところ、純粋な L-エピー-2-イノソースの無色結晶を 60 g 得た。この時の精製品の回収率は 60.7%、ミオイノシトールからの L-エピー-2-イノソースの全回収率は 60.6%であった。

【0076】

なお、上記 L-エピー-2-イノソースの精製品回収率は次の計算式により求めた。

精製品回収率 (%) = [精製単離した L-エピー-2-イノソース量 ÷ 培養上清液 400 ml 中に含まれた精製前の L-エピー-2-イノソースの量] × 100

また、上記 L-エピー-2-イノソースの全回収率は次の計算式により求めた。

【0077】

全回収率 (%) = [精製単離した L-エピー-2-イノソースのモル数 ÷ 液体培地 400 ml 中に含有されたミオイノシトールのモル数] × 100

【0078】

実施例 2第 1 の本発明の実施方法 (A) による L-エピー-2-イノソースの製造例 (2)

(1) 種培養物の調製

ミオイノシトール 2.0%、酵母エキス 0.2%、
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%、 K_2HPO_4 0.7%、 KH_2PO_4
 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01% を含む pH7 の液体培地 100 ml
 を 500 ml 容のバツフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。
 各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピー AB10119 株を接種し、
 27℃で 1 日間振とう培養した。この培養液を種培養物として用いた。

【0079】

(2) 4 L容ジャーファーマンターによるL-エピー-2-イノソースの製造
 ミオ-イノシトール 12.0%、酵母エキス 1.2%、
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%、 K_2HPO_4 0.7%、 KH_2PO_4
 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%を含むpH7の液体培地2.5リッ
 トルを、4 L容ジャーファーマンターに分注し、オートクレーブ滅菌した。この
 ジャーファーマンターにキサントモナス・エスピーAB10119株の、上記(1)の方法で調製した種培養物25mlを接種した。この後、培養温度は27℃
 、通気量は1vvm、回転数は200rpmで培養を実施した。培養は3日間行い
 、培養期間中のpHを5M NaOH及び3M HClで 7 ± 0.2 に自動調整
 した。3日間培養後の培養液を遠心分離(8,000rpm、20分間)し、上
 清を培養上清液として得た。

【0080】

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより前記と同様の条件で分析
 した。この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより下記の条件で分析し
 た。その結果、培養上清液中にはL-エピー-2-イノソースが60mg/ml(変換率50.6%)の濃度で生成していることがわかった。

【0081】

反応液からのL-エピー-2-イノソースの単離方法は、実施例1(b)に記載
 した方法に準じて行い、結晶として114g(精製品回収率76.0%)を得た。
 また、この時のミオ-イノシトールからのL-エピー-2-イノソースの全回収
 率は38.4%であった。

【0082】

なお、上記L-エピー-2-イノソースの変換率は、上記実施例1に準じた計算
 式で求め、また精製品回収率は次の計算式により求めた。

精製品回収率(%) = [精製単離したL-エピー-2-イノソース量 ÷ 培養上清
 液2.5リットル中に含有された精製前のL-エピー-2-イノソース量] × 100

また、上記L-エピー-2-イノソースのミオ-イノシトールからの全回収率は
 次の計算式により求めた。

全回収率(%) = [精製単離したL-エピー-2-イノソースのモル数 ÷ 培地2

、 5 リットル中に含有されたミオーイノシトールのモル数] $\times 100$

【0083】

実施例 3

第 1 の本発明の実施方法 (B) による L-エピー-2-イノソースの製造例

(1) 菌体の生産

ミオーイノシトール 0.5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%、 K_2HPO_4 0.7%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%を含む pH7 の液体培地 2 L を 500 ml 容のバッフル付き三角フラスコに 100 ml ずつ分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピー AB10119 株を接種し、27℃で 3 日間振とう培養した。この培養液を遠心分離して菌体を得た。得られた菌体を、0.05M リン酸緩衝液

(pH7.0) 200 ml で洗浄後、再度遠心分離し、洗浄菌体を得た。

【0084】

(2) L-エピー-2-イノソースの製造

上記により得られた洗浄菌体 35 g を、ミオーイノシトール 4 g を含有した 0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0) 400 ml (ミオーイノシトール濃度は 10 mg/ml) 中に加えた。得られた混合物を 30℃、24 時間緩やかにスターラーで攪拌しながら反応させた。反応終了後、反応液を液体クロマトグラフィーにより分析したところ L-エピー-2-イノソースが 6 mg/ml (変換率 60.7%) の濃度で生成、蓄積していた。反応液からの L-エピー-2-イノソースの単離方法は、実施例 1 (b) に記載した方法に準じて行い、結晶として 1.6 g (精製品回収率 66.7%) を得た。また、上記 L-エピー-2-イノソースのミオーイノシトールからの全回収率は 40.4% であった。

【0085】

なお、上記の L-エピー-2-イノソースの変換率は、上記実施例 1 に準じて求め、精製品回収率は次の計算式により求めた。

精製品回収率 (%) = [精製単離した L-エピー-2-イノソース量 \div 反応液 400 ml 中の精製前の L-エピー-2-イノソース量] $\times 100$

また、上記 L-エピ-2-イノソースのミオ-イノシトールからの全回収率は次の計算式により求めた。

全回収率 (%) = [精製単離した L-エピ-2-イノソースのモル数 ÷ 緩液 4 0 0 m l 中に添加したミオ-イノシトールのモル数] × 1 0 0

【 0 0 8 6 】

実施例 4

第 2 の本発明の実施方法 (C) によるエピ-イノシトールの製造例

(1) L-エピ-2-イノソースの生成

ミオ-イノシトール 2 5 . 0 % (5 0 0 g)、グルコース 1 . 0 %、酵母エキス 2 . 5 % を含む p H 未調整の液体培地 2 リットルを、1 0 0 m l ずつ 5 0 0 m l 容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスビー A B 1 0 1 1 9 株 (F E R M P - 1 7 3 8 2) を接種し、2 7 ℃ で 5 日間振とう培養した。培養液を遠心分離 (8 , 0 0 0 r p m、2 0 分間) し、培養上清液を得た。

【 0 0 8 7 】

この培養上清液を実施例 1、(1) に示した高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、培養上清液中には L-エピ-2-イノソースが 4 1 5 g (ミオ-イノシトールから L-エピ-2-イノソースへの変換率は 8 3 . 9 %) 生成していることがわかった。

【 0 0 8 8 】

(2) エピ-イノシトールの生成

前項 (1) で得た L-エピ-2-イノソース含有の培養上清液の 2 リットルに水素化ホウ素ナトリウム 2 9 . 2 g を徐々に加えた。還元反応を室温で行った。反応の終了後、培養上清液 (反応液) を高速液体クロマトグラフィーにより下記の条件で分析した。その結果、還元反応後の反応液 (培養上清液) は、生成したエピ-イノシトールの 2 3 5 . 8 g を含有し、副生成物として、ミオ-イノシトールの 1 0 2 . 4 g を含有していることがわかった (エピ-イノシトールとミオ-イノシトールの合計反応収率は 8 0 . 6 %)。L-エピ-2-イノソースからのエピ-イノシトールの変換率は 5 6 . 2 % であった。

【0089】

高速液体クロマトグラフィーの分析条件は以下の通りである。

カラム: Wakosil 5NH₂ : 4.6 × 250 mm

カラム温度 : 40℃

検出器 : RI DETECTOR ERC-7515A (ERMA CR. INC.)

注入量 : 20 μl

溶媒 : アセトニトリル-水 = 4 : 1

溶出時間 : エピーイノシトール ; 8.5分

なお、エピーイノシトールとミオーイノシトールの合計反応収率(%)は次式で計算した。

〔還元反応後の培養上清液中のエピーイノシトールのモル数とミオーイノシトールのモル数の合計 ÷ 還元反応前の培養上清液中のL-エピー-2-イノソースのモル数〕 × 100

また、上記のL-エピー-2-イノソースからのエピーイノシトールの変換率は次の計算式により求めた。

変換率(%) = 〔還元反応後の培養上清液中のエピーイノシトールのモル数 ÷ 還元反応前の培養上清液中のL-エピー-2-イノソースのモル数〕 × 100

【0090】

(3) エピーイノシトールの回収と単離の1例

前項(2)で得た還元反応後の反応液(培養上清液)を二等分した。一方の液を強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)C-20(H⁺型)300mlを充填したカラム(内径5cm、長さ30cm)に通過させ、その後このカラムに400mlのイオン交換水を通して洗浄した。この通過液及び洗浄液を合併して、強塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)A-113

(OH⁻型)600mlを充填したカラム(内径5cm、長さ60cm)に通過させ、その後このカラムに700mlのイオン交換水を通して洗浄した。

こうして得られた通過液及び水洗浄液を合併した。ここで合併により得られた水溶液は、エピーイノシトールと副生成物としてのミオーイノシトールとを含有するが、これら以外に不純物をほとんど含有しなかった。

【0091】

上記により得た水溶液を減圧下で300mlまで濃縮した。その濃縮液(300ml)の4分の1量(75ml)を、強塩基性陰イオン交換樹脂アンバーライト(登録商標)CG-400(OH⁻型)1500mlを充填したカラム(内径5cm、長さ200cm)に通過させ、その後このカラムに脱イオン水を通して溶出した。該カラムの溶出液はミオイノシトールを主として含む画分と、所望なエピーイノシトールを主として含む画分とに分け集めた。前記の濃縮液の残りの4分の3(225ml)についても同様な操作を行うことにより、エピーイノシトールを専ら含む溶出液を取得できた。これを濃縮乾固して、エピーイノシトールを73g得た。さらにこのエピーイノシトールを水に溶かし15%の水溶液とした後、エタノールを2倍量加えて5℃で一晩放置して再結晶させた。こうして純粋なエピーイノシトールの結晶63g(精製品回収率53.4%)。ミオイノシトールからのエピーイノシトールの全収率は25.2%であった。

【0092】

なお、上記エピーイノシトールの精製品回収率は次の計算式により求めた。

【0093】

精製品回収率(%) = [結晶として単離したエピーイノシトールの量 ÷ 還元反応後の上清液中のエピーイノシトールの量] × 100

また、上記のミオイノシトールからのエピーイノシトール全回収率は次の計算式により求めた。

全回収率(%) = [結晶として単離したエピーイノシトールの量 ÷ 培地1リットルに含有されたミオイノシトールの量] × 100

【0094】

(4) エピーイノシトールの回収と単離の第2例

前項(3)で二等分された還元反応後の反応液(培養上清液)の残りの一方を、強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)C-20(H⁺型)300mlを充填したカラム(内径5cm、長さ30cm)に通過させ、その後このカラムに400mlのイオン交換水を通して洗浄した。この通過液及び洗浄液を、強塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)A-113(OH⁻型)600

ml を充填したカラム(内径 5 cm、長さ 60 cm)に通過させ、その後このカラムに 700 ml のイオン交換水を通して洗浄した。

【0095】

上記により通過液及び水洗浄液を合併して、合併により得られた水溶液を減圧下で 300 ml まで濃縮した。その濃縮液 (300 ml) を強酸性陽イオン交換樹脂ダイヤイオン (登録商標) UBK 520M (Ca^{+} 型) 1500 ml を充填したカラム(内径 5 cm、長さ 200 cm)に通過させ、その後このカラムに脱イオン水を通して溶出した。該カラムの溶出液はミオイノシトールを主として含む画分と、所望なエピーイノシトールを主として含む画分とに分け集めた。このクロマトグラフィー操作でエピーイノシトールを 75 g 得た。さらにこのエピーイノシトールを水に溶かし 15 % の水溶液とした後、エタノールを 2 倍量加えて 5℃ で一晩放置して再結晶させた。こうして純粋なエピーイノシトールの結晶 66 g (精製品回収率 56.0 %) を得た。この時の出発原料として用いたミオイノシトールからのエピーイノシトールの全回収率は 26.4 % であった。

【0096】

なお、上記エピーイノシトールの精製品回収率及び全回収率は前項(3)と同様に計算した。

【0097】

実施例 5

第2の本発明の実施方法 (E) によるエピーイノシトールの製造例

(1) L-エピー-2-イノソースの生成

ミオイノシトール 25.0 %、グルコース 1.0 %、酵母エキス 0.7 % を含む pH 未調整の液体培地 100 ml を 500 ml 容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピー AB10119 株 (FERM P-17382) を接種し、27℃ で 5 日間振とう培養した。培養液を遠心分離 (8,000 rpm、20 分間) し、培養上清液を得た。

【0098】

この培養上清液を実施例 1、(1) に示した高速液体クロマトグラフィーによ

り分析した。その結果、培養上清液中にはL-エピー-2-イノソースが23 g (ミオーイノシトールからL-エピー-2-イノソースへの変換率93.0%)の量で生成していることがわかった。

【0099】

(2) エピーイノシトールの生成

前項(1)で得たL-エピー-2-イノソース含有の培養上清液100 mlに、5Mの水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH10に調整した。その後、直ちに水素化ホウ素ナトリウム1.3 gを培養上清液に徐々に加えた。還元反応を室温で行った。反応の終了後、培養上清液(反応液)を高速液体クロマトグラフィーにより前記実施例4、(2)記載の条件で分析した。その結果、還元反応後の反応液(培養上清液)は、生成したエピーイノシトールの18.4 gを含有し、副生成物として、ミオーイノシトールの0.8 gを含有していることがわかった(エピーイノシトールとミオーイノシトールの合計反応収率は82.6%)。L-エピー-2-イノソースからのエピーイノシトールの変換率は79.1%であった。

【0100】

この時のエピーイノシトールとミオーイノシトールへの合計反応収率は次の計算式により求めた。

エピーイノシトールとミオーイノシトールの合計反応収率(%) = [還元反応後の培養上清液中のエピーイノシトールのモル数とミオーイノシトールのモル数の合計 ÷ 還元反応前の培養上清液中のL-エピー-2-イノソースのモル数] × 100
また、上記のL-エピー-2-イノソースからのエピーイノシトールへの変換率は次の計算式により求めた。

変換率(%) = [還元反応後の培養上清液中のエピーイノシトールのモル数 ÷ 還元反応前の培養上清液中のL-エピー-2-イノソースのモル数] × 100

【0101】

反応液からのエピーイノシトールの回収と精製、単離の方法は、実施例4、(4)に記載した方法に準じて行った。エピーイノシトールの結晶として15.7 gを得た。このときの反応液中のエピーイノシトールからの精製品回収率は85.3%であった。反応液中のL-エピー-2-イノソースに基づくエピーイノシト

ールの収率は67.5%、出発原料として用いたミオーイノシトールからのエピーイノシトールの全回収率は62.8%であった。

【0102】

なお、上記の反応液中のエピーイノシトールからのエピーイノシトールの精製品回収率は次の計算式により求めた。

精製品回収率(%) = [精製単離したエピーイノシトール量 ÷ 還元反応後の培養上清液100ml中に含有された精製前のエピーイノシトール量] × 100

また、上記のL-エピー-2-イノソースに基づくエピーイノシトールの収率は次の計算式により求めた。

収率(%) = [精製単離したエピーイノシトールのモル数 ÷ 還元反応前の培養上清液100ml中に含有された還元反応前のL-エピー-2-イノソースのモル数] × 100

【0103】

また、上記のミオーイノシトールからのエピーイノシトールの全回収率は次の計算式により求めた。

全回収率(%) = [精製単離したエピーイノシトール量 ÷ 培養開始時の培養液100ml中に含有されたミオーイノシトール量] × 100

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 各種の医薬あるいは合成中間体として有用なL-エピー-2-イノソースとエピーイノシトールを安価なミオーイノシトールから効率よく製造できる新方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる変換能を有するグラム陰性細菌を、ミオーイノシトールに作用させて、ミオーイノシトールのL-エピー-2-イノソースへの変換によりL-エピー-2-イノソースを生成する方法が開発された。さらに、こうして得たL-エピー-2-イノソースを、水性反応媒質中で水素化ホウ素アルカリ金属またはその他のアルカリ金属水素化物よりなる還元剤と反応させて、エピーイノシトールとミオーイノシトールを生成させ、しかも得られた還元反応生成物からエピーイノシトールを分離および単離することから成るエピーイノシトールの新規な製造方法が提供される。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000242002]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋本石町4丁目4番20号

氏 名 北興化学工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000173913]

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都品川区上大崎3丁目14番23号
氏 名 財団法人微生物化学研究会